

CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE (TLC)

La fase stazionaria è distribuita su una superficie piana, che può essere un supporto di carta da filtro (*cromatografia su carta*, PC) o una lastrina in vetro o alluminio o plastica o altri materiali (*cromatografia su strato sottile*, TLC)

Sequenza operativa:



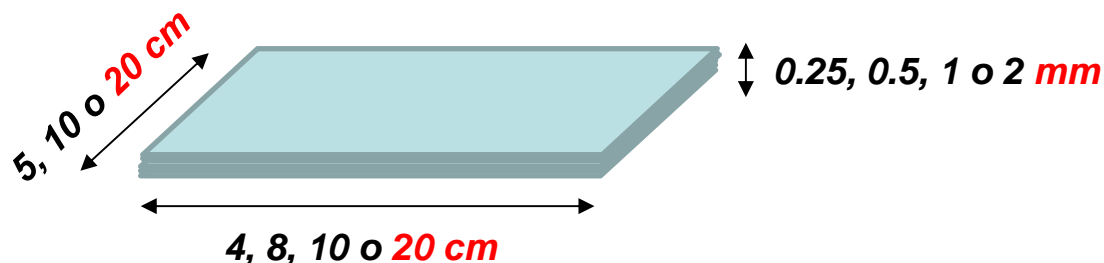
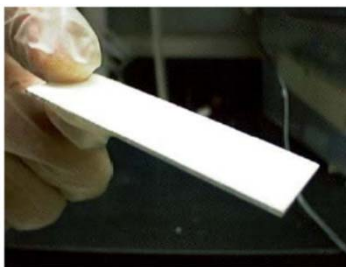
Preparazione del campione

Soluzioni **molto diluite** utilizzando solventi in cui la miscela di composti da separare è completamente solubile

Fase stazionaria

Composti lipofili (poco-medio polari): **gel di silice**, allumina, cellulosa acetilata, poliammidi

Composti idrofili (molto polari, ionici): Kieselguhr, cellulosa modificata per scambio ionico, silice e poliammidi modificate

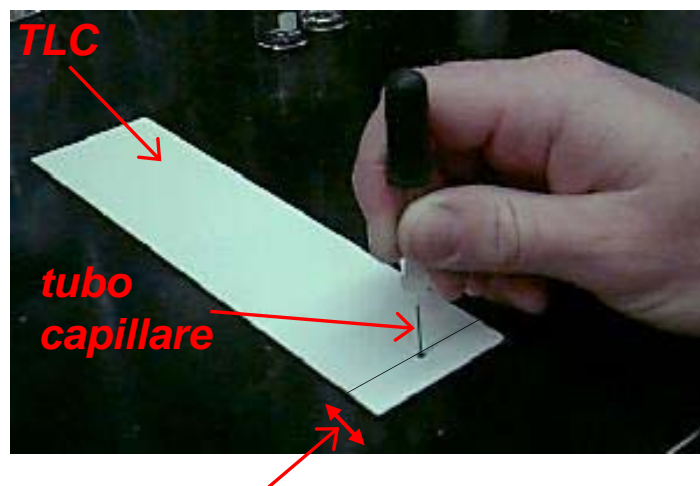


Fase mobile

Vari solventi (o miscele di solventi) con potere eluotropo che segue la serie di Trappe (TLC in fase diretta)

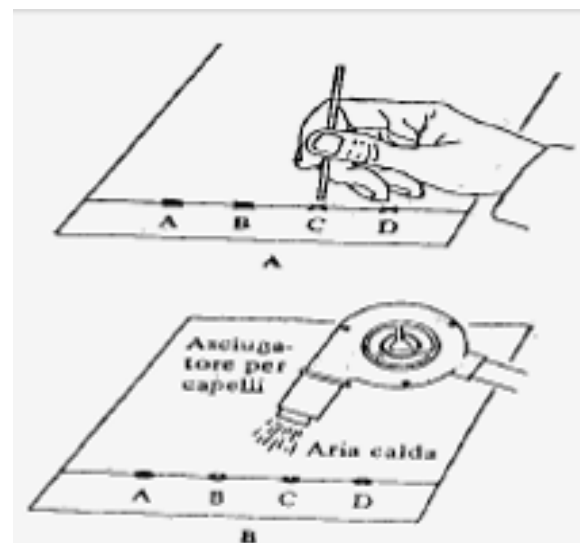
Caricamento del campione

La soluzione della miscela da separare va depositata sulla superficie, posandone con un **tubo capillare** una goccia ($0.5-5 \mu\text{L} \sim 2-20 \mu\text{g}$) su una linea che segna l'inizio del processo di eluizione



Circa 1 cm dal bordo inferiore
(al di sopra dell'altezza del solvente
nella camera di eluizione)

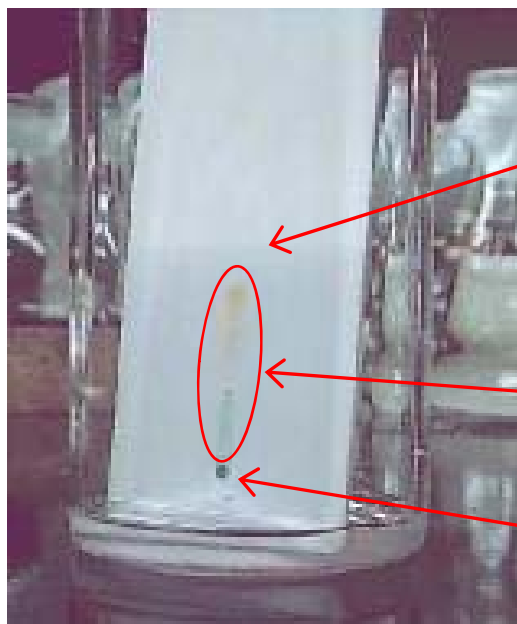
Far asciugare tra un'applicazione e l'altra
sullo stesso punto di caricamento



Sulle TLC si scrive solo a MATITA!!

Sviluppo della TLC

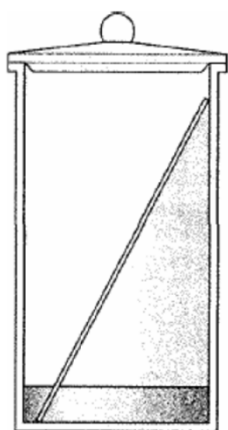
La TLC viene inserita in un contenitore chiuso (**camera di sviluppo o camera di eluizione**) contenente sul fondo la fase mobile che per capillarità fluisce sulla fase fissa trascinando gli analiti e separandoli



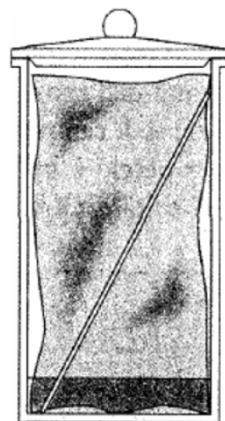
Fronte dell'eluente in ascesa per capillarità

Analiti in separazione

Punto di caricamento



La camera di eluizione, per la presenza della TLC, è divisa in due zone con diversa saturazione ⇒ **eluizione non omogenea**

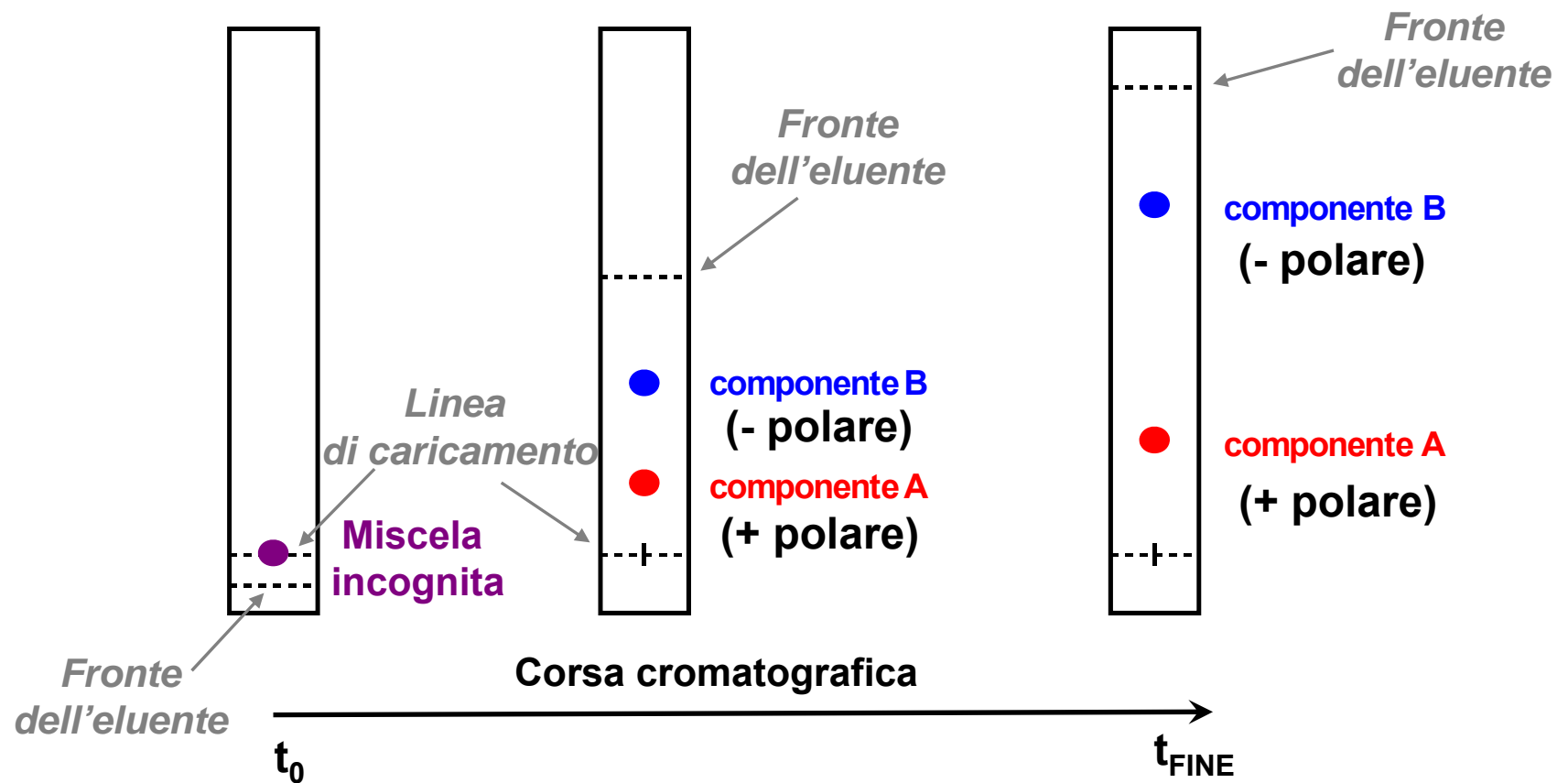


Per saturare in modo ottimale la camera di sviluppo si inserisce un pezzo di carta da filtro imbevuto di eluente



eluizione omogenea (cruciale per TLC 20x20 cm)

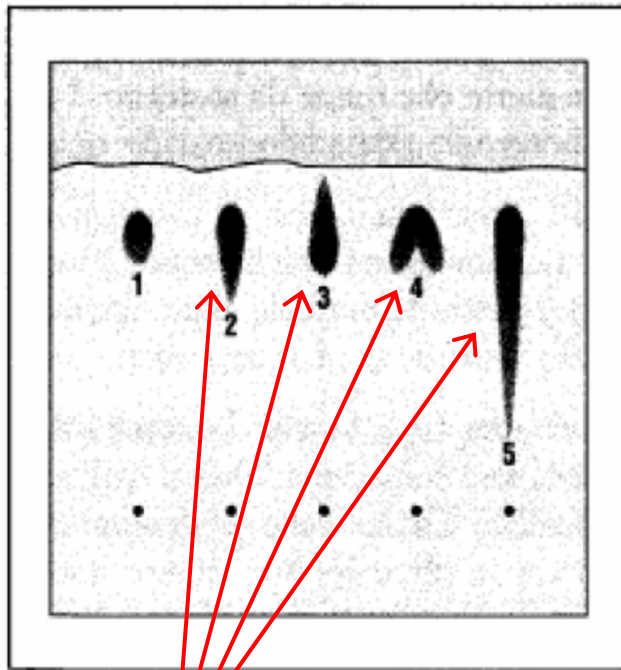
Quando il fronte dell'eluente è a pochi mm dal bordo superiore, si estrae la lastra, si segna la posizione del solvente e si asciuga



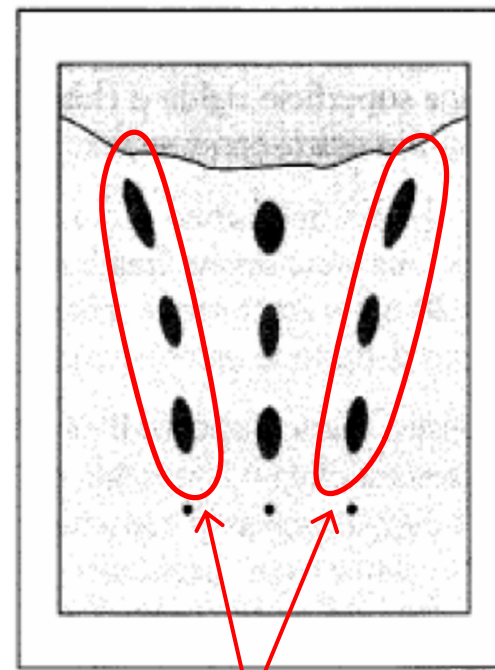
TLC in fase diretta: I componenti **meno polari** interagiscono di più con la fase mobile (e di meno con la fase fissa) e quindi migrano **piu' velocemente**

I componenti **più polari** interagiscono di meno con la fase mobile (e di più con la fase fissa) e quindi migrano **piu' lentamente**

Tipici problemi nello sviluppo della TLC



sovraccaricamento

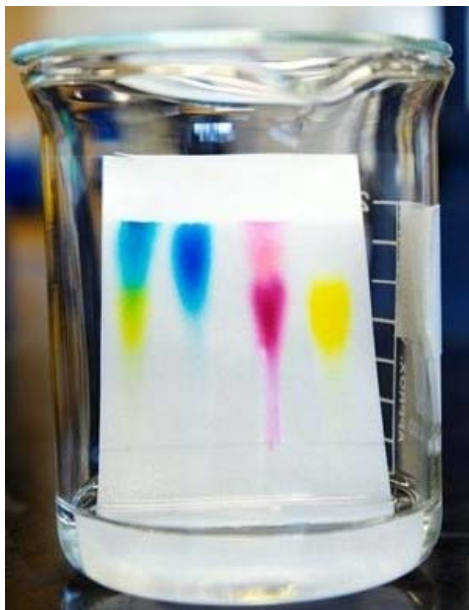


effetto bordo

Visualizzazione

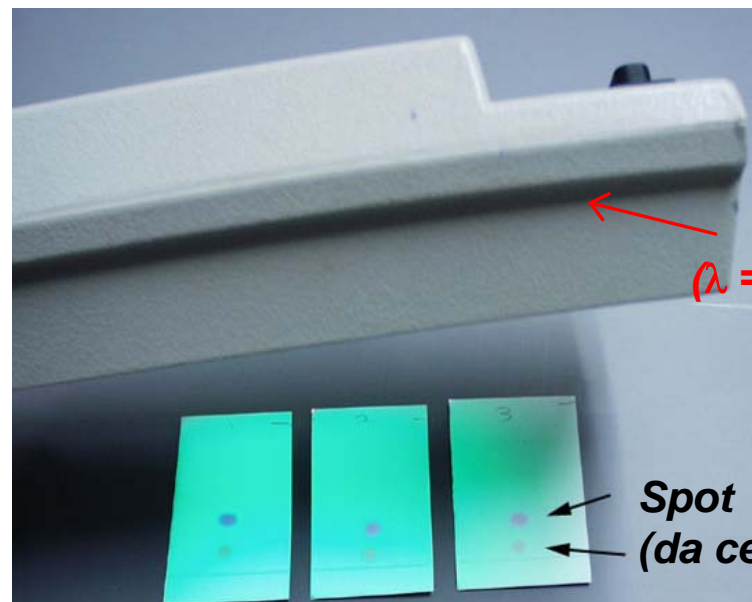
- **Composti che assorbono luce visibile**

composti aromatici coniugati, polieni etc.



- **Composti che assorbono luce UV ($\lambda < 400$ nm):**

composti aromatici, dieni, nitroderivati, composti carbonilici e carbossilici coniugati, etc.



può essere necessario aggiungere alla fase stazionaria un **indicatore di fluorescenza** per visualizzare meglio le macchie:

- Silicato di zinco e magnesio (λ_{MAX} 254 nm, fluorescenza verde)
- Pigmento organico (λ_{MAX} 366 nm, fluorescenza blu)

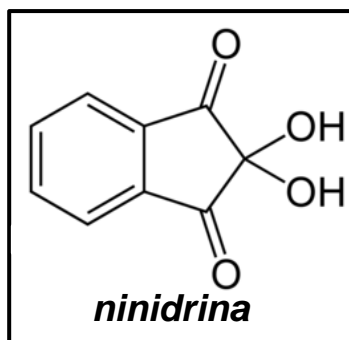
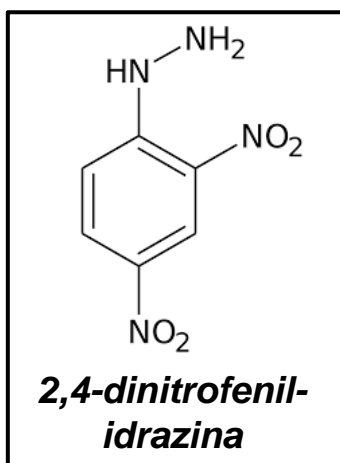
Visualizzazione

- Composti che non assorbono luce né visibile né UV



Si spruzza la lastra con un nebulizzatore contenente un **cromogeno** (reagente di localizzazione)

- acido solforico per composti organici (spot neri)
- iodio (I_2) per molecole contenenti doppi legami (spot bruni)
- AgNO₃ per alogenuri alchilici (spot neri)
- 2,4-dinitrofenil-idrazina per aldeidi e chetoni (spot arancioni)
- ninidrina per amminoacidi (spot rosso-violetti)



Valutazione quali-quantitativa

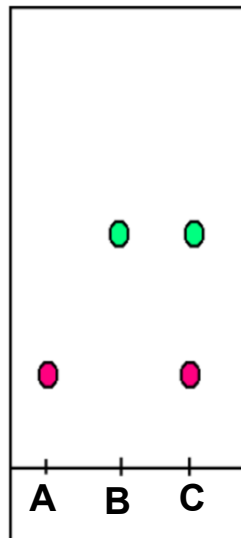
Il colore delle macchie non è un parametro sufficiente per l'identificazione degli spot

→ R_f (fattore di ritenzione, fattore di ritardo) = $\frac{\text{distanza percorsa dall'analita}}{\text{distanza percorsa dall'eluente}}$

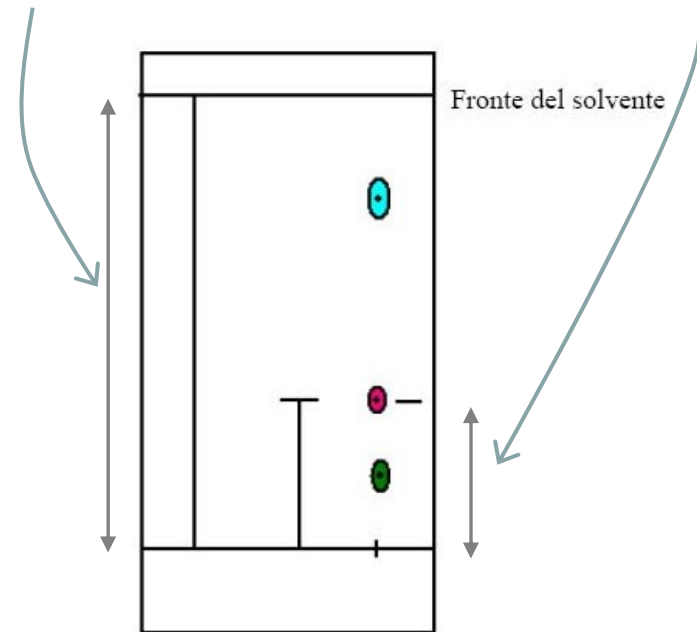
Il fattore di ritenzione dipende da:

- Natura chimica ed attività della fase stazionaria
- Dimensioni dei granuli della fase stazionaria
- Spessore dello strato sottile
- Temperatura e grado di saturazione della camera di eluizione
- Fase mobile

**CONFRONTO
CON STANDARD**



A = standard puro n.1
B = standard puro n.2
C = miscela di analiti

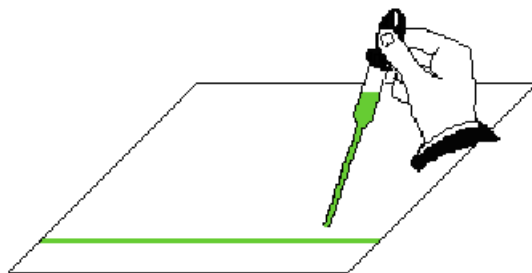


Applicazioni dell'analisi TLC

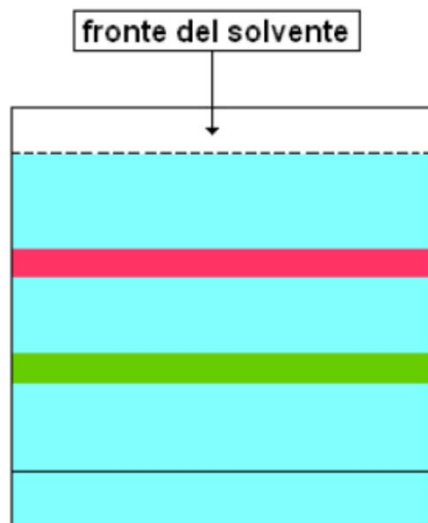
- **Scelta preliminare delle condizioni di una separazione su colonna cromatografica e per seguirne il suo andamento**
- **Seguire il decorso di una reazione chimica**
- **Ricerca di impurezze**
- **Saggi preliminari di presenza e/o identificazione di classi di composti**
- **Separazione di una miscela di composti a fini preparativi (PLC)**

TLC PREPARATIVA (PLC)

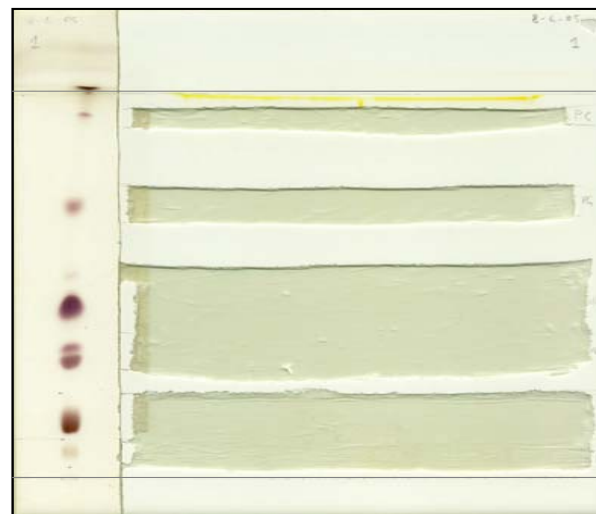
Obiettivo: separazione e recupero dei composti della miscela



Sviluppo e visualizzazione della PLC



Scraping della fase stazionaria



- Le sostanze sciolte in un solvente vengono caricate a striscio su una linea ad 1 cm circa dal bordo inferiore della piastra preparativa con una pipetta Pasteur
- Lastre TLC da 20 x 20 cm
- Spessore dello strato:

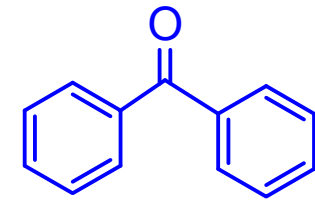
-	- 2 mm (fino a 100 mg di miscela)
	- 1 mm - 50 mg
	- 0,5 mm - 30 mg

Si gratta via lo strato di fase stazionaria, lo si suddivide finemente e lo si sospende in un solvente in grado di disciogliere il composto ivi adsorbito. Si recupera quest'ultimo per filtrazione su setto di vetro ed evaporazione del solvente

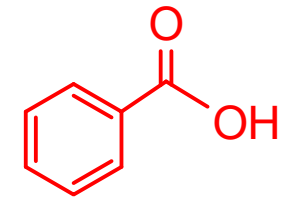
Procedura sperimentale per l'analisi TLC dei prodotti dell'estrazione liquido-liquido (ESERCITAZIONE N.2 – FASE II)

Verificare la purezza dei prodotti separati attraverso un'analisi TLC.

1. Preparare una lastra di silice con 3 punti. ✓
2. Sciogliere in tre provette una piccolissima quantità dei campioni (Prodotto N.1- fase organica e prodotto N.2 - fase acquosa) e della miscela iniziale, utilizzando acetato di etile come solvente.
3. Caricare sulla TLC mediante capillari la miscela di partenza e i due composti isolati.
4. Mettere a migrare la lastra TLC nella miscela eluente etere di petrolio/etere etilico (7:3).
5. Analizzare il risultato finale attraverso visualizzazione della TLC sotto luce UV.



benzofenone
(prodotto n.1)

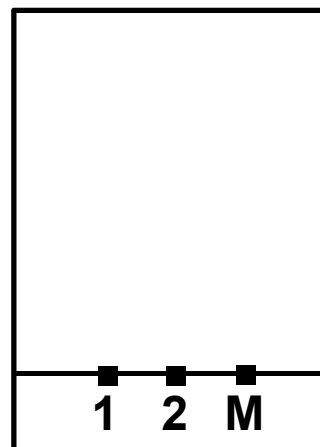


acido benzoico
(prodotto n.2)



**Preparazione del campione
(punto 2)**
Scelta di fase mobile e fase fissa
→
**Caricamento del campione
(punto 3)**

1 cm



**Sviluppo
(punto 4)**
→
**Visualizzazione
(punto 5)**

